

Bacterias fitopatógenas en el IVIA: prevenir es mejor que curar

Ester Marco-Noales y María Milagros López

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia

mlopez@ivia.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha: José F. Català, Clara Morente, Inma Navarro, Belén Álvarez, Ester Marco-Noales, María Martínez, Javier Peñalver, Adela Monterde, Teresa Gorris, María M. López, Pablo López y Félix Morán.

El grupo de Bacteriología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), pionero en España en el estudio de bacterias fitopatógenas, fue creado en 1977 por María Milagros López, que es también responsable, desde 1993, del Laboratorio Nacional de Referencia de Bacterias Fitopatógenas del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. A lo largo de estos 38 años, el grupo ha abordado proyectos relacionados con el diagnóstico, la epidemiología y el control biológico de distintas bacterias fitopatógenas, con participación en más de sesenta proyectos nacionales y europeos sobre especies de *Agrobacterium*, *Brenneria*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Xylophilus*. Actualmente cuenta con doce miembros: tres investigadores, tres técnicos, tres auxiliares y tres becarios en formación. Su actividad presente se plasma en las líneas

de investigación que a continuación se presentan, en colaboración con los grupos de R. Peñalver, M. Cambra, E.G. Biosca, J. Cubero, A. Palacio y E. Montesinos, entre otros, además de con numerosos grupos internacionales.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

La prevención de los daños causados por bacterias fitopatógenas, especialmente de las consideradas de cuarentena en la Unión Europea, se ha basado esencialmente en el desarrollo de técnicas de diagnóstico sensibles y específicas, en el conocimiento de los reservorios de los patógenos, sus estrategias de supervivencia en nuestras condiciones y su diversidad intraespecífica, y en el desarrollo de tratamientos preventivos, como el control biológico.

Detección y diagnóstico de bacterias fitopatógenas

Se han publicado más de 20 artículos SCI y participado en 10 protocolos internacionales sobre nuevos métodos de diagnóstico de bacterias fitopatógenas, de los que se señalan los más representativos. En cítricos, se ha puesto a punto un protocolo integrado de diagnóstico basado en PCR (Golmohammadi *et al.*, 2007), métodos serológicos y aislamiento para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causante de la canchros, y se ha desarrollado un kit de diagnóstico para material vegetal y psilas vectoras para el huanglongbing (greening), enfermedad que se asocia con tres especies de «*Candidatus Liberibacter*» (Bertolini *et al.*, 2014). En frutales, se han puesto a punto protocolos para la detección de *Agrobacterium* spp. basados en PCR (Cubero *et al.*, 1999), y de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, causante de la mancha bacteriana, basados en PCR en tiempo real (Palacio-Bielsa *et al.*, 2011). En frutales de pepita, se han diseñado técnicas serológicas y moleculares para la detección de *Erwinia amylovora* (Llop *et al.*, 2000), causante del fuego bacteriano de las rosáceas. En olivo, se ha desarrollado un protocolo de diagnóstico molecular que permite detectar simultáneamente cuatro virus y la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Bertolini *et al.*, 2003), causante de la tuberculosis. En solanáceas, se han desarrollado métodos de diagnóstico de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*, en material vegetal y en agua de riego (Caruso *et al.*, 2002, 2003; Marco-Noales *et al.*, 2008). Todas estas técnicas han sido transferidas a los Servicios de Sanidad Vegetal de las Comunidades Autónomas y algunas son la base de kits comerciales. Varios protocolos han sido adoptados por la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) y la *International Plant Protection Convention* (IPPC) de la FAO (EPPO 2005, 2013, 2014; IPPC 2014). La experiencia del grupo ha sido la base de una revisión invitada en el *Annual Review of Phytopathology* (De Boer y López 2012). El Laboratorio ha logrado recientemente la acreditación según la norma ISO 17025.

Se han detectado por primera vez en España más de veinte especies o patovares de bacterias fitopatógenas, entre ellas, recientemente, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* y *P. syringae* pv. *actinidifoliorum*, causantes del chancro bacteriano del kiwi y de las manchas foliares, respectivamente (Abelleira *et al.*, 2014, 2015), y «*Candidatus Liberibacter solanacearum*», asociado a desarreglos vegetativos en zanahoria y apio (Teresani *et al.*, 2014). También se ha descrito la nueva especie *Erwinia piriflorinigrans*, que produce necrosis en flores de peral (López *et al.*, 2011).

Epidemiología de las principales bacteriosis

La optimización de los métodos de detección ha permitido conocer mejor la epidemiología de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* en olivo (Quesada *et al.*, 2007) y la migración de *Agrobacterium tumefaciens* en distintas especies (Martí *et al.*, 1999). En *E. amylovora* se ha descrito la inducción

por cobre del estado viable no cultivable (VNC) (Ordax *et al.*, 2006), y la supervivencia en este estado en manzanas maduras (Ordax *et al.*, 2009) y en *Ceratitidis capitata* (Ordax *et al.*, 2015), por lo que pueden actuar como fuentes de inóculo. Se ha estudiado la capacidad de colonización de *Ralstonia solanacearum* en distintas especies (Álvarez *et al.*, 2008b) y la supervivencia de cepas españolas en agua, la influencia de la microbiota nativa, especialmente de fagos, y la inducción del estado VNC por oligotrofia (Álvarez *et al.*, 2007, 2008a). Recientemente, se ha demostrado la transmisión por semilla de «*Candidatus Liberibacter solanacearum*» en zanahoria (Bertolini *et al.*, 2014) y, en colaboración con el CITA de Zaragoza, la de *X. arboricola* pv. *pruni* en almendro.

Caracterización intraespecífica y genómica de bacterias fitopatógenas

Se ha realizado el análisis polifásico de cepas españolas de *E. amylovora* (Donat *et al.*, 2007; Llop *et al.*, 2011), *X. arboricola* pv. *pruni* y *R. solanacearum*. En todos los casos se ha demostrado que han sido varias las introducciones de cada uno de estos patógenos en nuestro país. Este tipo de estudios han permitido seleccionar marcadores específicos en *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Quesada *et al.*, 2008) y determinar patrones de diseminación de la tuberculosis en distintas zonas de cultivo de olivo (Quesada *et al.*, 2010b).

También se ha colaborado en la secuenciación del genoma de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010) y en el de *E. piriflorinigrans* (Smits *et al.*, 2013) y sus plásmidos (Barbé *et al.*, 2013).

Gestión integrada de las principales bacteriosis

Se han estudiado los mecanismos implicados en el control biológico de los tumores causados por *Agrobacterium* spp. mediante la cepa K84, se ha demostrado la transferencia de plásmidos entre el agente de biocontrol y el patógeno, y se ha estudiado el comportamiento de cepas transconjugantes (Penyalver *et al.*, 2000). En olivo, se ha comprobado la eficacia preventiva de los tratamientos cúpricos frente a la tuberculosis, tanto en la diseminación de las poblaciones epífitas de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* como en la disminución de los síntomas (Quesada *et al.*, 2010a), y se ha evaluado la sensibilidad varietal (Penyalver *et al.*, 2006). En hortalizas, se está tramitando la patente del uso de bacteriófagos para el control biológico de la marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum* (N.º: 201530730).

PERSPECTIVAS DE FUTURO

La experiencia de estos años nos anima a seguir investigando en los patógenos que en cada momento constituyen una amenaza más acuciante para la agricultura, como es actualmente el caso de «*Candidatus Liberibacter*» spp. y *Xylella fastidiosa*, porque la prevención es el mejor método para reducir las pérdidas que causan las bacteriosis en España.

REFERENCIAS

- Abelleira A, Ares A, Aguín O, Peñalver J, Morente CM, López MM, Sainz MJ y Mansilla P. (2015). J Appl Microbiol (en prensa).
- Abelleira A, Ares A, Aguín O, Picoaga A, López MM y Mansilla P. (2014). Plant Pathol 63: 691-9.
- Álvarez B, López MM y Biosca EG. (2007). Appl Environ Microbiol 73: 7210-7.
- Álvarez B, López MM y Biosca EG. (2008a). Microbiology 154: 3590-8.
- Álvarez B, Vasse J, Le-Courtois V, Trigalet-Démery D, López MM y Trigalet A. (2008b). Phytopathology 98: 59-68.
- Barbé S, Llop P, Blom J, Cabrefiga J, Goesmann A, Duffy B, Smits THM, Montesinos E y López MM. (2013). Plant Pathol 64: 1-13.
- Bertolini E, Felipe R, Sauer AV, Lopes S, Arilla A, Vidal E, Mourão-Filho FAA, Nunes WMC, Bové JM, López MM y Cambra M. (2014). Plant Pathol 63: 1149-58.
- Bertolini E, Olmos A, López MM y Cambra M. (2003). Phytopathology 93: 286-92.
- Bertolini E, Teresani GR, Loiseau M, Tanaka FAO, Barbé S, Martínez C, Gentit P, López MM y Cambra M. (2014). Plant Pathol 130: 5-12.
- Caruso P, Bertolini E, Cambra M y López MM. (2003). J Microbiol Methods 55: 257-72.
- Caruso P, Gorris MT, Cambra M, Palomo J, Collar J y López MM. (2002). Appl Environ Microbiol 68: 3634-8.
- Cubero J, Martínez MC, Llop P y López MM. (1999). J Appl Microbiol 86: 591-602.
- De Boer SH y López MM. (2012). Ann Rev Phytopathol 50:197-218.
- Donat V, Biosca EG, Peñalver J y López MM. (2007). J Appl Microbiol 103: 1639-49.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection). (2005). Diagnostics protocols for regulated pests. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35: 289-294. (MM López *et al.*).
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection). (2013). Diagnostics protocols for regulated pests. Diagnostic protocols for regulated pests PM 7/20 (2). *Erwinia amylovora*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 43: 21-45. (MM López *et al.*).
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection). (2014). Diagnostics protocols for regulated pests. PM 7/121 (1) «*Candidatus Liberibacter africanus*», «*Candidatus Liberibacter americanus*» and «*Candidatus Liberibacter asiaticus*» Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 44 (3), 376-389. (By M.M. López *et al.*).
- Golmohammadi M, Cubero J, Peñalver J, Quesada JM, López MM y Llop P. (2007). J Appl Microbiol. 103: 2309-15.
- IPPC (International Plant Protection Convention)– FAO. (2014). International Standards for Phytosanitary Measures Draft Annex to ISPM 27:2006. Diagnostic Protocols: *Erwinia amylovora*; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. (MM López *et al.*).
- López MM, Roselló M, Llop P, Ferrer S, Christen R y Gardan L. (2011). Int J Syst Evol Microbiol 61: 561-67.
- Llop P, Bonaterra A, Peñalver J y López MM. (2000). Appl Environ Microbiol 66: 2071-8.
- Llop P, Cabrefiga J, Smits THM, Dreó T, Barbe S, Pulawska J, Bultreys A, Blom J, Duffy B, Montesinos E y López MM. (2011). PLoS ONE 6:e28651.
- Marco-Noales E, Bertolini E, Morente C y López MM. (2008). Phytopathology 98: 949-55.
- Martí R, Cubero J, Daza A, Piquer J, Salcedo CI, Morente C y López MM. (1999). Eur J Plant Pathol 105: 39-50.
- Ordax M, Biosca EG, Wimalajeewa SC, López MM y Marco-Noales E. (2009). J Appl Microbiol 107: 110-6.
- Ordax M, Marco-Noales E, López MM y Biosca EG. (2006). Appl Environ Microbiol 72:3482-8.
- Ordax M, Piquer-Salcedo J, Santander RD, Sabater-Muñoz B, Biosca EG, López MM y Marco-Noales E. (2015). PLoS ONE 10(5): e0127560.
- Palacio-Bielsa A, Cubero J, Cambra MA, Collados R, Berruete IM y López MM. (2011). Appl Environ Microbiol 77: 89-97.
- Penyalver R, García A, Ferrer A, Bertolini E, Quesada JM, Salcedo CI, Piquer J, Pérez-Panadés J, Carbonell EA, del Río C, Caballero JM y López MM. (2006). Phytopathology 96: 313-9.
- Penyalver R, Vicedo B y López MM. (2000). Eur J Plant Pathol 106: 801-10.
- Rodríguez-Palenzuela P, Matas IM, Murillo J, López-Solanilla E, Bardaji L, Pérez-Martínez I, Rodríguez-Moskea ME, Penyalver R, López MM *et al.* (2010). Environ Microbiol 12,1604-1620.
- Quesada JM, García A, Bertolini E, López MM y Penyalver R. (2007). Int Microbiol 10:77-84.
- Quesada JM, Penyalver R, Pérez-Panadés J, Salcedo CI, Carbonell EA y López MM. (2010a). Crop Prot 29: 1413-20.
- Quesada JM, Penyalver R, Pérez-Panadés J, Salcedo CI, Carbonell EA y López MM. (2010b). Plant Pathol 59: 262-9.
- Quesada JM, Pérez-Martínez I, Ramos C, López MM y Penyalver R. (2008). Res Microbiol 159: 207-15.
- Smits THM, Rezzonico F, López MM, Blom J, Goesmann A, Frey JE, Duffy B. (2013). Syst Appl Microbiol 36: 449-56.
- Teresani GR, Bertolini E, Alfaro-Fernández AO, Martínez MC, Tanaka FA, Kitajima EW, Roselló M, Sanjuán S, Ferrándiz, JC., López MM, Cambra M y Font MI. (2014). Phytopathology 104: 804-11.